

明細書

リポソーム製剤

技術分野

[0001] 本発明は、ドラッグデリバリーシステムに有用なリポソーム製剤に関する。

背景技術

[0002] 近年、薬物を安全にかつ効率よく目的病巣部位に送達・分布させるドラッグデリバリーシステム(DDS)が盛んに研究されている。その方法のひとつとして、リポソーム、エマルジョン、リピッドマイクロスフェア、ナノパーティクルなどの閉鎖小胞を薬物の運搬体(担体)として利用することが検討されている。しかしながら閉鎖小胞を用いるDDSの実用化に際しては克服すべき様々な課題があり、中でも、生体側の異物認識機構からの回避および体内動態の制御は重要である。つまり、閉鎖小胞を標的部位に高い選択性で送達させるためには、肝臓、脾臓等の細網内皮系組織(RES)での捕捉を回避し、血液中のオプソニン蛋白質や血しょう蛋白質などの相互作用(吸着)による凝集を防止して血中安定性を高める必要がある。

[0003] この課題を解決する方法として、親水性高分子による膜修飾が知られている。親水性高分子で修飾された閉鎖小胞、特にリポソームは、高い血中滞留性が得られることにより、腫瘍組織や炎症部位などの血管透過性が亢進した組織への受動的な集積が可能となり、実用化が進められている(特許文献1~3および非特許文献3~5など参照)。親水性高分子で膜修飾するための修飾剤としては、一般的に、ポリエチレングリコール(PEG)に、リン脂質またはコレステロールなどの脂質を結合したポリエチレングリコール誘導体が好適に用いられる。商業的に入手可能な汎用の修飾剤は、ジアシルフォスファチジルエタノールアミンなどのリン脂質を結合したポリエチレングリコール誘導体である。

[0004] 上記のような修飾が施されるリポソームは脂質二重膜で形成される閉鎖された小胞であり、その小胞空間内に水相(内水相)を含む。リポソームは、脂質二重膜層の一枚膜からなるユニラメラ小胞(Small Unilamellar Vesicle, SUV、Large Unilamellar Vesicle, LUV)および複数枚からなる多重ラメラ小胞(Multilamellar Vesicle, MLV)

などの膜構造が知られている。リポソームに内包された薬物の漏出を抑制するために、リポソームの膜構造をMLV膜とする提案もある(特許文献4参照)。

[0005] また、上記のようなりポソーム内への薬物封入方法は種々あるが、pH勾配法などのイオン勾配法(特許文献5ー7、非特許文献6など参照)を利用すれば、薬物を高濃度に封入できることが知られている。

[0006] 特許文献1:特表平5-505173号公報
特許文献2:特公平7-20857号公報
特許文献3:特許第2667051号公報
特許文献4:国際公開01/000173号パンフレット
特許文献5:米国特許第5077056号明細書
特許文献6:特許第2847065号公報
特許文献7:特許第2659136号公報
非特許文献1:Cancer Lett., 1997, 118(2), p.153
非特許文献2:Br.J.Cancer., 1997, 76(1), p.83
非特許文献3:D.D. Lasic著「LIPOSOMES from Physics to Applications」,Elsevier, 1993
非特許文献4:Martin C.Woodle, Gerrit Storm編「Long Circulating Liposomes:Old Drugs, New Therapeutics」, Springer,1997
非特許文献5:D.D.Lasic、D.Papahadjopoulos編「Medical Applications of LIPOSOMES」, Elsevier, 1998
非特許文献6:G. Gregoriadis編「Liposome Technology Liposome Preparation and Related Techniques」2nd edition, Vol.I-III, CRC Press

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 上記のようなりポソームに担持させる薬物のうちには、中性条件より高いpH領域では安定性が悪い薬物があり、この場合には、薬物が脂質二重膜中に取り込まれてゐるにせよ、内水相に取り込まれてゐるにせよ、リポソームの内水相を酸性に保つ必要がある。またpH勾配を利用して弱塩基性の薬物をリポソームに封入(担持)する場合

には、クエン酸緩衝液を用いて内水相のpHを4前後の酸性条件とし、リポソームの主膜材の相転移点以上の温度(例えば60°C程度)まで加温する。しかしながら、このようにリポソーム内が酸性条件であり、場合によっては高温に晒されることにより、製造時および保存期間中に、膜の劣化により安定性が低下することが懸念される。この点に着目し、酸性で保持する必要のある薬物を、特に親水性高分子で膜修飾したリポソームに担持させたリポソーム製剤の保存性について検討したところ、いくつかの親水性高分子修飾リポソームでは、未修飾のリポソームよりも製造時あるいは保存期間中に担持している薬剤の分解が起こりやすい場合があり、その結果、リポソーム製剤としての保存安定性を損ないやすいという知見を得た。本発明は、このような知見に基づいて、酸性で保持する必要のある薬物あるいは薬物を封入するための手段に起因して結果的に酸性条件下に保持されたかたちとなった薬物を、特に親水性高分子で膜修飾したリポソームに担持させる場合において、親水性高分子本来の膜修飾効果を保持したまま、膜安定性に優れ、保存安定性に優れたリポソーム製剤を提供することを目的としている。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者は、上記に鑑みて、一般的なリン脂質を主膜材とし、親水性高分子で膜修飾したリポソームで、酸性環境で保持する必要のある薬物を内水相に保持したリポソーム製剤についてさらに検討したところ、内水相の酸性環境に対して脂質の加水分解が起こり、その結果、リポソーム製剤としての保存安定性が損なわれやすいという知見を得た。これに基づいてさらに検討し、保持安定性が損なわれ易いリポソーム製剤は、親水性高分子が膜の内外表面ともに修飾されたものであることを知見した。これらから、リポソームの外表面のみを親水性高分子で修飾すればよいことを想到した。そしてこのような構造のリポソーム製剤は、内水相が酸性環境であっても保存安定性を確保できることを確認することができた。さらに、アミノ基、アミジノ基、グアジニノ基などを含む塩基性化合物(カチオン化剤)による膜修飾は、内水相が酸性環境であってもリポソーム膜を安定化する効果があり、したがってこのような塩基性化合物を膜成分として含むリポソーム製剤は保存安定性に優れることを見出し、以下のような本発明を完成するに至った。

[0009] (1)リン脂質を主膜材として含む脂質二重膜で形成されたユニラメラ小胞と、該小胞内に存在するpHが5以下の内水相とを備え、かつ薬物を担持させたリポソームであって、前記小胞は、外表面のみが親水性高分子で修飾されたものである、リポソーム製剤。

[0010] (2)前記薬物が、pH5より大きいpH領域で不安定な薬物である前記(1)のリポソーム製剤。

(3)前記薬物を、少なくとも0.05mol薬物／mol脂質の濃度で担持する前記(1)または(2)のリポソーム製剤。

(4)前記薬物を、少なくとも0.1mol薬物／mol脂質の濃度で担持する前記(1)または(2)のリポソーム製剤。

[0011] (5)前記主膜材が、相転移点50°C以上のリン脂質である前記(1)～(4)のいずれかのリポソーム製剤。

(6)前記リン脂質が、水素添加されたリン脂質である前記(1)～(5)のいずれかのリポソーム製剤。

(7)前記リン脂質が、スフィンゴリン脂質である前記(1)～(5)のいずれかのリポソーム製剤。

[0012] (8)前記脂質二重膜の膜成分として、前記リン脂質以外の他の脂質類をさらに含む前記(1)～(7)のいずれかのリポソーム製剤。

(9)前記脂質二重膜の膜成分として、コレステロールをさらに含む前記(6)または(7)のリポソーム製剤。

(10)前記脂質二重膜の膜成分として、アミノ基、アミジノ基およびグアジニノ基から選ばれる基を含む塩基性化合物をさらに含む前記(1)～(9)のいずれかのリポソーム製剤。

(11)前記塩基性化合物が、3,5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩である前記(10)のリポソーム製剤。

[0013] (12)前記親水性高分子が、分子量500～10,000ダルトンのポリエチレングリコールである前記(1)～(11)のいずれかのリポソーム製剤。

(13)前記親水性高分子は、親水性高分子のリン脂質またはコレステロール誘導体

で導入される前記(1)～(12)のいずれかに記載のリポソーム製剤。

[0014] (14) 前記リポソーム製剤の平均粒子径が、40～140nm程度である前記(1)～(13)のいずれかのリポソーム製剤。

(15) 前記リポソーム製剤の平均粒子径が、50～130nmである前記(1)～(13)のいずれかのリポソーム製剤。

(16) 前記リポソーム製剤の平均粒子径が、60～120nmである前記(1)～(13)のいずれかのリポソーム製剤。

[0015] (17) 内水相のpHが2～5である前記(1)～(16)のいずれかのリポソーム製剤。

[0016] (18) 上記のようなリポソーム製剤の製造方法として、内水相のpHが5以下となるよう、リン脂質を含む脂質二重膜のユニラメラ層構造の小胞を調製した後、親水性高分子脂質誘導体を添加して前記小胞の外表面のみを修飾し、小胞の調製時に内水相にあらかじめ添加するか、小胞調製後に小胞外から前記脂質二重膜を通過せしめて薬物を封入して薬物を封入して薬物を担持させた上記(1)のリポソーム製剤の製造方法。

(19) 薬物の封入は小胞調製後にイオン勾配法を用いて小胞外から前記脂質二重膜を通過せしめることにより行われるものである上記(18)に記載のリポソーム製剤の製造方法。

発明の効果

[0017] 上記のような特定構造のリポソームであれば、膜内外双方ともに親水性高分子を付加して膜修飾する場合に比べ、全体では相対的に低い修飾率で親水性高分子の効果を発現することができる。すなわち無用な修飾を含まないため、リポソーム膜の安定性に優れ、また、酸性環境下における内水相での脂質の無用な加水分解を抑制することができる。特に、本発明に係るリポソーム製剤は、上述した制約により酸性で保持されている内水相において製剤の構造上、必要なものを的確に排除し、それに伴い、無用な脂質の加水分解を抑制することによって、製造時および保存時の分解を抑制して、内封した薬物を高濃度に安定して担持することができ、かつ親水性高分子本来の高い血中滞留性などの膜修飾効果を保持したまま、保存安定性に優れたリポソーム製剤とすることができます。このような特徴から、本発明のリポソーム製剤は

、疾患の治療および／または診断に効果を有する。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]親水性高分子脂質誘導体(PEG₅₀₀₀-DSPE)の安定試験後のTLCの撮像を示す。

[図2]親水性高分子脂質誘導体(PEG₅₀₀₀-DSPE)の安定試験後のTLCの撮像を示す。

[図3]保存試験におけるPEG₅₀₀₀-DSPEの残存率を示す図である。

[図4]保存試験におけるHSPCの分解物の割合(%)を示す図である。

[図5]保存試験におけるHSPCの分解物の割合(%)を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0019] 以下、本発明をより詳細に説明する。

リポソームは、リン脂質二重膜からなる閉鎖小胞であり、その小胞空間内に水相(内水相)を含む。リポソーム製剤は、このリポソームを担体とし、これに薬物を担持させたものである。リポソームは、前述したように脂質二重膜の1枚層からなるユニラメラ(一枚膜)小胞(SUV、LUV)および複数枚からなる多重ラメラ小胞(MLV)などが知られているが、本発明に係るリポソームは一枚膜である。そのうちでも特に、LUV(large unilamellar vesicle)リポソームである。また、SUV(small unilamellar visicle)も好ましい。

なお本発明では、リポソーム製剤を構成する全小胞中、ユニラメラ小胞が占める割合は、存在比で全体の50%以上であればよく、80%以上であることが好ましい。

また、本発明において薬剤を担持させるリポソームは、pH5以下の内水相を含み、かつユニラメラ脂質二重膜は、後述するように、その外膜表面のみが選択的に、親水性高分子で表面修飾された特定の膜修飾構造を有する。

[0020] 上記脂質二重膜は、その主膜材として、少なくともリン脂質を含む。

リン脂質は、一般的に、分子内に長鎖アルキル基より構成される疎水性基とリン酸基より構成される親水性基とを持つ両親媒性物質である。本発明で使用されるリン脂質としては、フォスファチジルコリン(=レシチン)、フォスファチジルグリセロール、フォスファチジン酸、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルセリン、フォスフ

アチジルイノシトールなどのグリセロリン脂質;スフィンゴミエリン(Sphingomyelin)などのスフィンゴリン脂質;カルジオリピンなどの天然あるいは合成のジフォスファチジル系リン脂質およびこれらの誘導体;これらを常法に従って水素添加したもの(例えば、水素添加大豆フォスファチジルコリン)などを挙げることができる。以下、これらのリン脂質を「リン脂質類」と称することもある。

これらのうちでも、水素添加大豆フォスファチジルコリン(HSPC)などの水素添加されたリン脂質、スフィンゴミエリン(SM)などが好ましい。

リポソームは、主膜材として單一種のリン脂質を、または複数種のリン脂質を含むことができる。

[0021] また、リポソームは、主膜材として相転移温度が生体内温度(35~37°C)より高いリン脂質を用いることが好適である。なぜなら、このようなリン脂質を用いることにより、保存時に、または、血液などの生体中で、リポソーム内に封入された薬物がリポソームから外部へ容易に漏出しないようにすることができるからである。これらのリポソームは、主膜材の相転移温度以上で製造することが好ましい。なぜなら、主膜材の相転移温度以下の温度では、粒子径制御が困難であるからである。例えば、主膜材の相転移温度が50°C付近である場合、50~80°C程度が好ましく、より具体的には60~70°C程度で製造されることが好ましい。

[0022] 本発明の特定形態のリポソームを安定的に形成できるものであれば、上記主膜材とともに他の膜成分を含んでいてもよい。例えば、リン脂質以外の脂質もしくはその誘導体(以下、他の脂質類と称することもある)を含み、上記リン脂質とともに混合脂質による膜を形成することが好ましい。

他の脂質類としては、リン酸を含まない脂質が挙げられ、特に限定されないがグリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質および安定化剤として後述するコレステロールなどのステロール等およびこれらの水素添加物などの誘導体を挙げることができる。リポソームは、主膜材としてのリン脂質とともに、他の脂質類を含む混合脂質による膜で形成されるのが好ましい。

[0023] 脂質二重膜を構成する膜脂質全体中、主膜材であるリン脂質の割合は、通常20~100mol%であり、好ましくは40~100mol%である。

また上記他の脂質類の膜脂質全体中の割合は、通常0ー80mol%であり、好ましくは0ー60mol%である。

[0024] 本発明において、上記のような脂質二重膜は、外膜側が選択的に親水性高分子で修飾されている。親水性高分子としては、特に限定されないがポリエチレングリコール、ポリグリセリン、ポリプロピレングリコール、フィコール、ポリビニルアルコール、ステレンー無水マレイン酸交互共重合体、ジビニルエーテルー無水マレイン酸交互共重合体、ポリビニルピロドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリビニルメチルオキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタアクリルアミド、ポリメタアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリヒドロキシプロピルメタアクリレート、ポリヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリアスパルトアミド、合成ポリアミノ酸などが挙げられる。

なおこれら親水性高分子は、脂質に結合していない側の末端がアルコキシ化(例えば、メトキシ化、エトキシ化、プロポキシ化)されているものが保存安定性に優れることから好ましい。

[0025] これらの中でも、製剤の血中滞留性を優れたものにする効果があることから、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリグリセリン(PG)、ポリプロピレングリコール(PPG)が好ましい。

PEGの分子量は、特に限定されない。PEGの分子量は、通常500ー10,000ダルトンであり、好ましくは1,000ー7,000ダルトン、より好ましくは2,000ー5,000ダルトンである。

PGの分子量は、特に限定されない。PGの分子量は、通常100ー10000ダルトンであり、好ましくは200ー7000ダルトン、より好ましくは400ー5000ダルトンである。

PPGの分子量は、特に限定されない。PPGの分子量は、通常100ー10,000ダルトンであり、好ましくは200ー7,000ダルトン、より好ましくは1,000ー5,000ダルトンである。

[0026] これらの中でも、ポリエチレングリコールは最も汎用であり、血中滞留性を向上させる効果があり、好ましい。

ポリエチレングリコールは、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ の繰り返し構造を有する直鎖状の高分

了である。ポリエチレングリコールは、水にも有機溶媒にも可溶な両親媒性の特性(*amphipathic property*)を有する高分子であり、かつ毒性が低いことから、医薬品の安定化、体内動態の改善のために広く応用されている。この毒性の低いことが知られているポリエチレングリコールで修飾された担体(例えばリポソーム)中に薬物を担持した薬物担体(例えばリポソーム製剤)は安全性が高い。

[0027] なお、本発明において、「血中滞留性」とは、例えば薬物担体が投与された宿主において、薬物が担体に内封された状態で血液中に存在する性質を意味する。

薬物は、担体から放出されると速やかに血中から消失し、暴露する。血中滞留性が良いと、薬物をより少ない量で投与することが可能である。

また、本発明において、「暴露」とは、担体の外部に放出された薬物が外部環境に対し作用を及ぼすことを意味する。具体的には、放出された薬物は標的部位に近接し、接触することによりその作用(例えば、抗腫瘍効果)を発揮する。薬物が標的部位に作用することにより、標的部位のDNA合成が行われている細胞周期にある細胞に局所的に作用するなどの、期待された効果を示す。

[0028] このようなリポソームは、後述するように脂質二重膜のユニラメラ小胞の未修飾リポソームを形成した後、外部より親水性高分子で膜表面を修飾すれば、脂質二重膜の外膜のみを選択的に表面修飾することができる。この際、親水性高分子の導入ための修飾剤として、親水性高分子脂質誘導体を用いると、親水性高分子部分が外方に向かって突出した状態で、疎水性部分である脂質部分がリポソームの脂質二重膜中に入り込み安定して保持されるので、リポソームの脂質二重膜の外膜表面上に、脂質に結合した親水性高分子を存在させ、分布させることができる。

[0029] 上記親水性高分子脂質誘導体の脂質(疎水性部分)としては、特に限定されない。例えば、疎水性の領域を有する化合物(疎水性化合物)を挙げることができる。疎水性化合物としては、後述する混合脂質を構成するリン脂質、ステロールなどの他の脂質類、あるいは直鎖脂肪族アルコール、直鎖脂肪族アミン、グリセリン脂肪酸エステルなどが挙げられる。中でも、リン脂質が好ましい態様の一つである。

[0030] 上記リン脂質に含まれるアシル鎖は、飽和脂肪酸であることが望ましい。アシル鎖の鎖長は、 $C_{14}-C_{20}$ が望ましく、さらには $C_{16}-C_{18}$ であることが望ましい。アシル鎖とし

ては、例えば、ジパルミトイル、ジステアロイル、パルミトイilstearoイルが挙げられる。

リン脂質は、特に制限されない。リン脂質としては、例えば、上記の親水性高分子と反応可能な官能基を有するものを使用することができる。このような親水性高分子と反応可能な官能基を有するリン脂質の具体例としては、アミノ基を有するfosfaチジルエタノールアミン、ヒドロキシ基を有するfosfaチジルグリセロール、カルボキシ基を有するfosfaチジルセリンが挙げられる。上記fosfaチジルエタノールアミンを使用するのが好適な態様の1つである。

[0031] 親水性高分子の脂質誘導体は、上記親水性高分子と上記脂質とから誘導される。親水性高分子と脂質との組み合わせは、特に限定されず、目的に応じて適宜組み合わせたものを使用することができる。例えば、リン脂質、ステロール等の他の脂質類、直鎖脂肪族アルコール、直鎖脂肪族アミン、グリセリン脂肪酸エステルの中から選ばれる少なくとも1つと、PEG、PG、PPGの中から選ばれる少なくとも1つとが結合した親水性高分子の誘導体が挙げられる。親水性高分子がPEGである場合、脂質としてリン脂質、コレステロールを選択するのが好適な態様の1つである。このような組み合わせによるPEGの脂質誘導体としては、例えば、PEGのリン脂質誘導体またはPEGのコレステロール誘導体が挙げられる。

[0032] 親水性高分子の脂質誘導体は、脂質の選択により、正電荷、負電荷、中性の選択が可能である。例えば、脂質としてDSPEを選択した場合、リン酸基の影響で負電荷を示す脂質誘導体となり、また脂質としてコレステロールを選択した場合、中性の脂質誘導体となる。脂質の選択は、その目的に応じ、選択することが可能である。

[0033] 本発明では、上記例示した親水性高分子の脂質誘導体の中でも、PEGのリン脂質誘導体が好ましい態様の一つとして挙げられる。PEGのリン脂質誘導体の具体例としては、ポリエチレングリコールジステアロイルfosfaチジルエタノールアミン(PEG-DSPE)が挙げられる。PEG-DSPEは、汎用の化合物であり入手容易であることから好ましい。

[0034] このような親水性高分子の脂質誘導体は、従来公知の方法によって製造することができる。親水性高分子の脂質誘導体の一例であるPEGのリン脂質誘導体を合成す

る方法としては、例えば、PEGに対し反応可能な官能基を有するリン脂質と、PEGとを、触媒を用いて反応させる方法が挙げられる。この触媒としては、例えば、塩化シアヌル、カルボジイミド、酸無水物、グルタルアルデヒドが挙げられる。このような反応により、前記官能基とPEGとを共有結合させてPEGのリン脂質誘導体を得ることができる。

[0035] 本発明において、リポソームは、上記親水性高分子あるいは親水性高分子の脂質誘導体を単独でまたは2種以上の組み合わせで含んでいてもよい。

上記親水性高分子脂質誘導体による膜脂質(総脂質)の修飾率は、膜脂質に対する比率で、通常0.1～20mol%、好ましくは0.1～5mol%、より好ましくは0.5～5mol%とすることができる。なお、肝臓内で作用させる薬剤を内封させた場合など、血中滞留性をそれほど必要としないときは、リポソーム製剤の保存時安定性を主目的として修飾率を0.25～5mol%に設定することが好ましい。

ここでの総脂質とは、親水性高分子脂質誘導体以外の膜を構成するすべての脂質の総量であり、具体的に、リン脂質類および他の脂質類、さらに他の表面修飾剤を含む場合にはこの表面修飾剤も含む。

[0036] このような親水性高分子の脂質誘導体を用いて表面修飾されたリポソームは、血漿中のオプソニンタンパク質等が当該リポソームの表面へ吸着するのを防止して当該リポソームの血中安定性を高め、RESでの捕捉を回避することが可能となり、薬物の送達目的とする組織や細胞への送達性を高めることができる。

[0037] 特に本発明では、リポソームは、親水性高分子がリポソーム外表面にのみ分布する条件下で形成され、脂質二重膜の外膜が上記親水性高分子で選択的に修飾されている。このようなリポソームでは、その外膜表面の親水性高分子鎖はリポソーム外方に向かって分布しており、一方、脂質二重膜の内水相側内膜は表面修飾されていないため、内水相内には実質的に親水性高分子鎖が分布しない。このような分布構造であれば、内水相が酸性条件であっても、二重膜の内外膜の両側上に親水性高分子が分布するものに比して、膜の安定性を確保することができる。また二重膜の内外膜の両側上に分布するものに比して、全体量として少ない親水性高分子で血中安定性の効果を得ることができる。

[0038] 本発明に係るリポソームは、上記リン脂質、他の脂質、親水性高分子およびその脂質誘導体とともに、上記膜構造を保持しうるものであって、リポソームに含むことができる他の膜成分を、本発明の目的を損なわない範囲で含むことができる。

他の膜成分としては、脂質の物性を変化させ担体の膜成分に所望の特性を付与するための、前記親水性高分子以外の表面修飾剤が挙げられる。他の表面修飾剤としては、特に限定されないが、脂質に、前記親水性高分子以外の化合物が結合したものが挙げられる。

[0039] 親水性高分子以外の化合物としては、特に限定されないが、例えばグルクロン酸、シアル酸、デキストラン、プルラン、アミロース、アミロペクチン、キトサン、マンナン、シクロデキストリン、ペクチン、カラギーナンなどの水溶性多糖類;酸性官能基を有する化合物;アミノ基、アミジノ基、グアジニノ基などの塩基性官能基を有する塩基性化合物などが挙げられる。

[0040] 特に、本発明では、これら化合物のうちでも、塩基性化合物を脂質の加水分解を抑制する物質として含有することができる。一般的に脂質は、温度、pHによって加水分解が起こることが知られている。特にSn-1とSn-2位における脂肪酸エステルは、加水分解を受けやすく、リゾ脂質および脂肪酸に分解することが知られている(Gritら, Chem. Phys. Lipids 64,3-18,1993)。これら分解物は、従来の脂質膜組成を乱し、それにより脂質膜の透過性を向上させることにより、リポソームの安定性が損なわれる。このため特に、酸性環境で保持する必要のある薬剤を内水相に保持するためには、酸性環境における脂質の安定性を向上させることがあるが、本発明では、塩基性化合物を膜に含有させることにより、リポソーム表面を正に帯電させることにより脂質の加水分解を抑制することができる。

[0041] 塩基性化合物としては特に限定されないが、オクタデシルアミン(ODA)、N-メチル-n-オクタデシルアミン(MODA)、N,N-ジメチル-n-オクタデシルアミン(DMODA)、臭化ステアリルトリメチルアンモニウム(TMOSA)などのアミン(アンモニウム塩も含む)化合物が挙げられる。TMOSAなどの4級アンモニウム塩を有する脂質誘導体は低い濃度で、脂質膜表面を正に帯電することが可能であることから望ましい。

[0042] また、塩基性化合物としては、特開昭61-161246号に開示されたDOTMA、特

表平5-508626号に開示されたDOTAP、特開平2-292246号に開示されたトランスフェクタム(Transfectam)、特開平4-108391号に開示されたTMAG、国際公開第97/42166号に開示された3,5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩、DOSPA、TfxTM-50、DDAB、DC-CHOL、DMRIEなどの化合物も挙げられる。

[0043] 上記他の表面修飾剤が、脂質に、塩基性官能基を有する化合物が結合した物質である場合には、カチオン化脂質と称される。カチオン化脂質の脂質部分はリポソームの脂質二重膜中に安定化され、塩基性官能基部分は担体の脂質二重層の膜表面上(外膜表面上および/または内膜表面上)に存在することができる。カチオン化脂質で膜を修飾することにより、リポソーム膜と細胞との接着性等を高めることができる。

[0044] 本発明において、上記リポソームの内水相は、pH5以下であり、好ましくはpH2～pH5であり、より好ましくはpH3～pH5であり、特に好ましくは約pH4である。これにより、pH5を超えると不安定な薬物を安定に担持することができる。内水相のpHは、リポソーム調製時に、生体内で許容し得る生理的pHの緩衝液で調整することができる。

[0045] 上記のようなりポソームには、種々の薬物を担持させることができる。例えば治療のための薬物としては、具体的に、核酸、ポリヌクレオチド、遺伝子およびその類縁体、抗癌剤、抗生物質、酵素剤、抗酸化剤、脂質取り込み阻害剤、ホルモン剤、抗炎症剤、ステロイド剤、血管拡張剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシン受容体拮抗剤、平滑筋細胞の増殖・遊走阻害剤、血小板凝集阻害剤、抗凝固剤、ケミカルメディエーターの遊離阻害剤、血管内皮細胞の増殖促進または抑制剤、アルドース還元酵素阻害剤、メサンギウム細胞増殖阻害剤、リポキシゲナーゼ阻害剤、免疫抑制剤、免疫賦活剤、抗ウイルス剤、メイラード反応抑制剤、アミロイドーシス阻害剤、一酸化窒素合成阻害剤、AGEs(Advanced glycation endproducts)阻害剤、ラジカルスカベンチャー、タンパク質、ペプチド、グリコサミノグリカンおよびその誘導体、オリゴ糖および多糖およびそれらの誘導体等が挙げられる。

[0046] 本発明のリポソーム製剤は、pH5より大きいpHでは不安定になるような薬物を特に安定に担持することができる。このような薬物としては、具体的に塩酸ドパミン、メシル

酸ガベキサート、ノルエピネフリン、塩酸プロムヘキシン、メクロプラミド、エピネフリン、ビタミンB1、ビタミンB6、カルボプラチン、塩酸ゲムシタビン、酒石酸ビノレビン、硫酸ビンクリスチン、塩酸ドキソルビシン、塩酸エピルビシン、塩酸ダウノルビシン等が挙げられる。

[0047] また診断のための薬物としては、X線造影剤、超音波診断剤、放射性同位元素標識核医学診断薬、核磁気共鳴診断用診断薬などの体内診断薬が挙げられる。この他、本発明のリポソームの膜形態を損なわず、pH5以下の液成分に含有あるいは接触しても影響されない薬物、さらにはpH5以下の内水相に封入するのに適した薬物であれば、治療用の薬物も診断用の薬物も特に限定することなく担持させることができる。

[0048] 薬物はその種類によっても所望担持量が異なるが、一般的には高担持率であることが望ましい。本発明では、内水相pHが5以下であることにより、イオン勾配法を利用して薬物を高濃度に担持することができる。

本発明のリポソーム製剤において、好ましい薬物担持量は、リポソーム膜の総脂質に対する濃度で、少なくとも0.05mol薬物/mol脂質であり、より好ましくは少なくとも0.1mol薬物/mol脂質である。ここでの総脂質とは、親水性高分子脂質誘導体以外の膜を構成するすべての脂質の総量であり、具体的に、リン脂質類および他の脂質類、さらに他の表面修飾剤を含む場合にはこの表面修飾剤も含む。

なお本発明において「担持」とは、本質的に、リポソーム(担体)の閉鎖空間内に薬物が封入された状態をいうが、薬物の一部を、膜内に含む状態で、あるいはリポソームの外表面に付着した状態で含んでいてもよい。

[0049] 本発明のリポソーム製剤は、投与経路次第で医薬的に許容される安定化剤および/または酸化防止剤をさらに含むものであってもよい。

安定化剤としては、特に限定されないが、例えば、グリセロール、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、またはシュクロースのような糖類が挙げられる。また、膜構成成分の他の脂質として上述したコレステロール(Cholesterol)などのステロールはこの安定化剤として作用する。

酸化防止剤としては、特に限定されないが、例えば、アスコルビン酸、尿酸、トコフェ

ロール同族体(例えば、ビタミンE)が挙げられる。なお、トコフェロールには、 α 、 β 、 γ 、 δ の4個の異性体が存在するが本発明においてはいずれも使用できる。使用される安定化剤および/または酸化防止剤は、剤型に応じて上記の中から適宜選択されるが、これらに限定されるものではない。このような安定化剤および酸化防止剤は、それぞれ単独でまたは2種以上組み合わせて使用することができる。また、酸化防止の観点からは、上記分散体は窒素充填包装とすることが望ましい。

[0050] 本発明のリポソーム製剤は、投与経路次第で医薬的に許容される添加物をさらに含むものであってもよい。このような添加物の例として、水、生理食塩水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターーチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン(HSA)、マニトール、ソルビトール、ラクトース、PBS、生体内分解性ポリマー、無血清培地、医薬添加物として許容される界面活性剤、前述した生体内で許容し得る生理的pHの緩衝液などが挙げられる。

添加物は、上記の中から適宜選択され、あるいはそれらを組合せて使用されるが、これらに限定されるものではない。

[0051] 本発明のリポソーム製剤の大きさは特に限定されないが、球状またはそれに近い形態をとる場合には、粒子外径の直径が、LUVの場合は、70nm～140nm、好ましくは80nm～130nm、より好ましくは90nm～120nmである。また、SUVの場合は、40nm～140nm、好ましくは50～130nm、より好ましくは60～120nmである。

粒子外径の直径とは、動的光散乱法により測定されるリポソーム製剤全粒子の直径の平均値であり、本発明において具体的には、Zetasizer (Malvern Instruments, 3000 HSまたはS ZEM 5002)を用いて測定した。

[0052] リポソーム製剤の製造においては、最終滅菌法として、濾過滅菌法が用いられる。濾過滅菌法においては、リポソームは透過するが、指標菌として用いられる

Brevundimonas diminuta(サイズ、約0.3×0.8μm)は濾過されないことが要求されるため、*Brevundimonas diminuta*に較べ十分に小さい粒子であることが必要である。粒径が100nm付近であることは、この濾過滅菌工程をより確実にする上でも重要である。

[0053] 本発明では、これら添加物を含む態様のリポソーム製剤を、医薬組成物として供することができる。本発明の医薬組成物は、通常の方法、例えば0~8°Cでの冷蔵あるいは1~30°Cの室温で保存することができる。

[0054] 次に、本発明の特定構造のリポソームの好ましい製造方法を例示するが、これに限定されるものではない。

例えばフラスコ内で、リン脂質等の膜構成成分を、クロロホルム等の有機溶媒により混合し、有機溶媒を留去後に真空乾燥することによりフラスコ内壁に薄膜を形成させる。次に、当該フラスコ内に内水溶液を加え、激しく攪拌することにより、リポソーム分散液を得る。リポソームの内水相のpHは、添加する内水相溶液を必要に応じpH調整剤などで所望のpHに調整することにより調整できる。次いで、得られたリポソーム分散液を遠心分離し、上清をデカンテーションし精製することにより、リポソーム分散液として得ることができる。親水性高分子によりリポソーム表面を修飾する手段として、ポリエチレングリコール(PEG)のリン脂質やコレステロールなどとの誘導体が好適に用いられ、上述の手法などを用いて得たリポソーム分散液にポリエチレングリコール誘導体をそのままあるいは水溶液として添加することによりPEG鎖が外表面にのみ分布するリポソームを製造することができる。

[0055] また上記とは別に、反応活性な官能基を持つリン脂質等の膜構成脂質を含有するリポソームを常法にて製造した後、リポソーム外液に片末端活性化PEGを添加して官能基を持つリン脂質等の膜構成脂質と結合させることにより、リポソームを製造することもできる。

[0056] またリポソームは、上記方法以外にも、上記の各構成成分を混合し、高圧吐出型乳化機により高圧吐出させることにより得ることもできる。この方法は、「ライフサイエンスにおけるリポソーム」(寺田、吉村ら; シュプリンガー・フェアラーク東京(1992))に具体的に記載されており、この記載を引用して本明細書の記載しているものとする。

[0057] 上記において、リポソームを所望のサイズにサイジングするために、いくつかの技術が利用可能である(G.Gregoriadis編「Liposome Technology Liposome Preparation and Related Techniques」2ndedition, Vol.I-III、CRC Press)。この記載を引用して本明細書の記載されているものとする。

リポソーム分散液は、エクストルーダーを用いて、フィルターを複数回強制通過させることによりユニラメラ化することができる。通常、フィルターは、所望径より大径の孔径をもつもの、最後に所望径の得られるものの孔径の異なるものを2種以上使用する。口径の異なるフィルターを用いて、エクストルージョンの回数を多くするほどユニラメラ化率が高くなり、実質的に一枚膜リポソームとみなすことができる。実質的にユニラメラ小胞とは、具体的には、リポソーム製剤を構成する全担体(小胞)中、ユニラメラ小胞が占める割合が、存在比で全体の50%以上であればよく、80%以上であることが好ましい。

[0058] 上記のようなリポソームに薬物を担持するには、薬物を含む水溶液でリポソームを構成する脂質膜を水和させることにより薬物をリポソームに担持させる方法(Passive loading)、あるいはリポソーム膜の内側／外側にイオン勾配を形成することで、薬物はこのイオン勾配に従いリポソーム膜を透過させ担持させる方法(Remote loading)がある(前記サイジング技術を記載した文献および米国特許第5192549号、米国特許第5316771号など参照)。本発明におけるリポソーム製剤の好適な製造方法は、Remote loadingである。この方法では高い薬物／脂質を達成でき、臨床に有効な高担持率のリポソーム製剤を得ることができる。

[0059] Remote loading法は、内水相と外水相の間にpH勾配を形成することにより達成することができる。pH勾配を形成する方法として、あらかじめ、低いpHで上記の方法にてリポソームを調製し、その後外水相を置換することでpH勾配を形成することができる。

[0060] リポソーム膜を隔てて形成される勾配として Na^+ / K^+ 濃度勾配を用いる方法がある。 Na^+ / K^+ 濃度勾配に対するRemote loading法により予め形成されているリポソーム中に薬剤を添加する技術は、米国特許第5077056号に記載されており、これを参考して行うことができる。なおこの記載を引用して本明細書に記載しているものとす

ことができる。

[0061] リポソームの内側と外側との間にpH勾配を形成する方法は、内側が高く／外側が低いアンモニウムイオン濃度勾配および／またはプロトン化しうるアミノ基を有する有機化合物濃度勾配を用いてもよい。プロトン化しうるアミノ基を有する有機化合物は、低分子量のものが望ましく、メチルアミン、エチルアミン、プロピルアミン、ジエチルアミン、エチレンジアミン、アミノエタノール等が挙げられるがこれに限定されるものではない。

[0062] なお、アンモニウムイオン濃度勾配に対するRemote loading法により予め形成されているリポソーム中に薬剤を添加する技術は、米国特許5192549号に記載されており、これを参照して行うことができる。なおこの記載を引用して本明細書に記載されているものとすることができる。具体的には、0.1～0.3Mのアンモニウム塩(例えば硫酸アンモニウム)を含有する水性緩衝液中で予めリポソームを形成し、外部媒体をアンモニウムイオンを含有していない媒質、例えばシュクロース溶液と交換することでアンモニウムイオン勾配を形成する。内部アンモニウムイオンはアンモニア及びプロトンにより平衡化し、アンモニアは脂質膜を透過して拡散することでリポソーム内部から消失する。アンモニアの消失に伴ってリポソーム内の平衡がプロトン生成の方向に連続的に移動する。その結果、リポソーム内にプロトンが蓄積され、リポソームの内側／外側にpH勾配が形成される。このpH勾配を有するリポソーム分散液に薬剤を添加することによって薬剤がリポソーム中に内封される。

[0063] アンモニウムイオン勾配を形成するアンモニウム塩は、特に限定されないが硫酸アンモニウム、水酸化アンモニウム、酢酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム、コハク酸アンモニウム、アンモニウムラクトビオネート、炭酸アンモニウム、酒石酸アンモニウム、及びシュウ酸アンモニウムが含まれる。

[0064] リポソームの内側と外側との間にpH勾配を形成する方法は、Ionophoreを用いる方法もある。Ionophoreを用いてリポソームの内側と外側との間にpH勾配を形成し、Remote loading法によりリポソーム中に薬剤を導入する技術は、米国特許第5837282号に記載されており、これを参照して行うことができる。なおこの記載を引用して本明細書に記載されているものとすることができる。

[0065] リポソームの内側と外側との間にpH勾配を形成し、Remote loading法の具体例としては以下の方法がある。

フラスコ内で、リン脂質等の膜構成成分を、クロロホルム等の有機溶媒により混合し、有機溶媒を留去後に真空乾燥することによりフラスコ内壁に薄膜を形成させる。次いで、酸性緩衝液(例えばpH4の緩衝液)を加え振とうしリポソーム分散液を得る。さらに必要に応じリポソーム粒径のサイジングを行い、リポソーム外液をゲルろ過などの方法によりpHが中性付近の外水相に置換する方法や適当なpH調整剤によりリポソーム外水相のpHを中性付近(例えばpH7～7.5付近)に調整する方法等によりpH勾配を形成し、このリポソーム分散液に薬物を含む水溶液を加え、この溶液をある時間加温することにより薬物を担持させることができる。なお、本発明において、親水性高分子の修飾は、前述した通り脂質二重膜のユニラメラ小胞を形成した後であれば、薬物担持操作の前後どちらでも行うことができる。

[0066] リポソーム製剤の非経口的投与の経路としては、例えば点滴などの静脈内注射(静注)、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射を選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。リポソーム製剤の具体的な投与方法としては、医薬組成物をシリンジや点滴によって投与することができる。また、カテーテルを患者または宿主の体内、例えば管腔内、例えば血管内に挿入して、その先端を標的部位付近に導き、当該カテーテルを通して、所望の標的部位またはその近傍あるいは標的部位への血流が期待される部位から投与することも可能である。

[0067] 本発明のリポソーム製剤は、病気に既に悩まされる患者に、疾患の症状を治癒するか、あるいは少なくとも部分的に阻止するために十分な量で投与される。例えばリポソーム製剤に封入される薬物の有効投与量は、通常、一日につき体重1kgあたり0.01mgから100mgの範囲で選ばれる。しかしながら、本発明のリポソーム製剤はこれらの投与量に制限されるものではない。投与時期は、疾患が生じてから投与してもよいし、あるいは疾患の発症が予測される時に発症時の症状緩和のために予防的に投与してもよい。また、投与期間は、患者の年齢、症状により適宜選択することができる。

実施例

[0068] 次に実施例、試験例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例、試験例に限定されるべきものではない。

なお、各例で用いた成分の分子量は次のとおりである。

水素添加大豆レシチン(HSPCと略記、分子量790、リポイド(Lipoid)社製SPC3)
コレステロール(Cholと略記、分子量386. 65、ソルベイ(Solvay)社製)
スフィンゴミエリン(Sphingomyelin; SMと略記、分子量703. 3、アバンチポーラーリピッズ(Avanti Polar Lipidos)社製)
ポリエチレングリコール5000-フォスファチジルエタノールアミン(PEG₅₀₀₀-DSPEと略記、分子量6075、日本油脂社製)
3,5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩(分子量609. 41)
オクタデシルアミン(Octadecylamine; ODAと略記)(東京化成:分子量269. 51)、
N-メチル-n-オクタデシルアミン(N-Methyl-n-octadecylamine; MODAと略記)(東京化成:分子量283. 54)、
N,N-ジメチル-n-オクタデシルアミン(N,N-Dimethyl-n-octadecylamine; DMODAと略記)(東京化成:分子量297. 56)
臭化ステアリルトリメチルアンモニウム(Stearyltrimethylammonium Bromide; TMODAと略記)(東京化成:分子量392. 5)
ドキソルビシン(塩酸ドキソルビシン:Doxorubicin Hydrochloride USP23(BORYUNG):分子量579. 99)

[0069] (実施例1)ドキソルビシン内封リポソームの製造例

この実施例1では、本発明のリポソーム製剤例を示す。以下に示すように、低pH条件下(pH4)で製造したリポソームに、親水性高分子脂質誘導体(PEG₅₀₀₀-DSPE:分子量5000ダルトンのポリエチレングリコールのジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン誘導体)を添加することにより、リポソームの外膜表面に親水性高分子(PEG鎖)を分布させ、さらにイオン勾配法により薬物を導入することでLUVリポソームを製造した。

水素添加大豆フォスファチジルコリン(HSPC):コレステロール(Chol)=54:46のモル比でt-ブタノールに溶解し、凍結乾燥させて膜成分の混合脂質を調製した。

300mMのクエン酸溶液と、300mMのクエン酸三ナトリウム溶液とを混合し、pH4.0に調整した内水相溶液と、pH7.5に調整した外水相溶液とを調製した。

[0070] 上記で調製した混合脂質を0.37g秤量した後に、内水相溶液10mLを加え、68°Cの恒温槽にて15分間膨潤したのち、ボルテックにて攪拌し、リポソーム粗分散液を調製した。68°Cに加温したエクストルーダー(Lipex Biomembranes社製)を用いて孔径200nmのフィルターを5回通し、孔径100nmのフィルターに交換後、さらに2回同様の操作を行い(Φ200nm×5、Φ100nm×5、Φ100nm×5)、LUVリポソーム分散液を調製した。エクストルージョン後のサンプルは氷冷した。

[0071] 上記で調製したリポソーム分散液を、外水相で充分に置換したゲルカラム(Sepharose 4 Fast Flow)にてゲルろ過を行い、pH勾配を形成した。ゲルろ過後のサンプルは氷冷した。

[0072] ゲルろ過後のリポソームの脂質定量(HSPC定量)を行い、HSPC定量より算出されたHSPC濃度をもとに、PEG₅₀₀₀-DSPE(日本油脂社製)を、1.0mol%になるよう加え、60°C、30分攪拌し、PEG₅₀₀₀-DSPEを導入した。

[0073] さらにHSPC定量より算出されたHSPC濃度をもとに、塩酸ドキソルビシン/HSPC=0.2(w/w)になるように塩酸ドキソルビシン量を計算し、計算結果をもとに必要量の塩酸ドキソルビシンを秤量し10% Sucrose(pH9.0)溶液を用いて10mg/mLの溶液を調製した。リポソーム分散液に所定量の塩酸ドキソルビシン溶液(10mg/mL)を加え60°Cで60分攪拌を行い塩酸ドキソルビシンの導入を行った。塩酸ドキソルビシン導入後のサンプルは氷冷した。10% Sucrose(pH6.5)で充分に置換したカラム(Sepharose 4 Fast Flow, Φ2.8cm×20cm)を用いてゲルろ過を行いリポソームに封入されていない塩酸ドキソルビシンを除去した。

[0074] 実施例1において、リポソームリン脂質は、リン脂質Cテストワロー(和光純薬社製)を用いて定量した。

またリポソーム内に封入されたドキソルビシン濃度は、ドキソルビシンリポソーム40μLにメタノール2mLを加えた溶液について、480nmでの吸光度を分光光度計で測定して求めた。

粒子径は、リポソーム分散液20μLを生理食塩水で3mLに希釈し、Zetasizer

3000HS (Malvern Instruments.)で測定した平均粒子径である。得られたリポソームを表1に示す。

[0075] (比較例1)ドキソルビシン内封リポソームの製造例

この比較例1では、本発明範囲外のリポソーム製剤例を示す。親水性高分子脂質誘導体(PEG₅₀₀₀-DSPE)をリポソーム形成時に共存させることにより、リポソームの二重膜の内外膜の両側上に親水性高分子(PEG鎖)を分布させた以外は、実施例1と同様のリポソーム成分を使用して、リポソーム製剤を製造した。

すなわち、実施例1と同じ混合脂質(HSPC:Chol=54:46)を0.37g秤量し、その後HSPC濃度をもとにPEG₅₀₀₀-DSPEを2.0mol%になるようにPEG₅₀₀₀-DSPEを0.073g秤量し、エタノール1mLを加え、65°Cの恒温槽にて30分間溶解させた。完全溶解確認後、内水相10mLを加え、さらに65°Cで60分加温攪拌を行いリポソーム粗分散液を調製した。エクストルーダー用いて、実施例1と同じ操作を行い、エクストルージョン後のサンプルは氷冷した。

[0076] 調製したリポソームを、外水相で充分に置換したゲルカラム(Sepharose 4 Fast Flow)にてゲルろ過を行い、実施例1と同様にpH勾配を形成し、ゲルろ過後のサンプルは氷冷した。

[0077] ゲルろ過後のリポソームの脂質定量(HSPC定量)により算出されたHSPC濃度をもとに、塩酸ドキソルビシン/HSPC=0.2(w/w)になるように塩酸ドキソルビシン量を計算し、計算結果をもとに必要量の塩酸ドキソルビシンを秤量し、10%Sucrose(pH9.0)溶液を用いて10mg/mLの溶液を調製した。

リポソーム分散液に所定量の塩酸ドキソルビシン溶液(10mg/mL)を加え、実施例1と同様に塩酸ドキソルビシンの導入操作を行い、リポソームに封入されていない塩酸ドキソルビシンを除去した。

実施例1と同様に、リポソームリン脂質の定量、リポソーム内に封入されたドキソルビシン量、粒子径を測定した。得られたリポソームを表1に示す。

[0078] (実施例2)本発明のドキソルビシン内封リポソームの製造例

膜成分に、スフィンゴミエリン(SM):Chol=55:45の混合脂質を用いて、本発明のリポソーム製剤を製造した。SM:Cholを55:45のモル比でクロロホルム/メタノール

混液に溶解し、溶媒を減圧留去し薄膜を形成した。300mMのクエン酸溶液と、300mMのクエン酸三ナトリウム溶液を混合しpH4.0に調整して内水相溶液とした。混合脂質O. 30gを秤量し、内水相溶液5mLを加え、70°Cで10分間水和させた。時々、55°Cに暖めたバス型ソニケーターで超音波をかけることで、脂質を均一に分散させた。

得られた脂質分散液を65°Cに保温したエクストルーダー(Lipex Biomembranes 社製)を用いて、孔径400nmのフィルターを3回通し、孔径200nmのフィルターに交換後さらに3回通し、孔径100nmのフィルターに交換後さらに2回同様の操作を行った(Φ400nm×3、Φ200nm×3、Φ100nm×5、Φ100nm×5)。エクストルージョン後のサンプルは氷冷した。

調製したリポソームを生理食塩水にて充分に置換したゲルカラム(Sepharose 4 Fast Flow)にてゲルろ過を行った。ゲルろ過後のサンプルは氷冷した。

[0079] ゲルろ過後のリポソームの脂質定量(SM定量)を行い、SM定量より算出されたSM濃度をもとに、PEG₅₀₀₀-DSPEを0.75mol%になるように加え60°C、30分攪拌し、PEG₅₀₀₀-DSPEを導入した。

さらにSM定量より算出されたSM濃度をもとに、リポソームの総脂質量に対して20mol%塩酸ドキソルビシン量を計算し、計算結果をもとに必要量の塩酸ドキソルビシンを秤量し、生理食塩水を用いて10mg/mLの溶液を調製した。リポソーム分散液に所定量の塩酸ドキソルビシン溶液(10mg/mL)を加え1N NaOHまたは飽和炭酸水素ナトリウム水でpH7.4に調整した後、65°Cで30分攪拌を行い塩酸ドキソルビシンの導入を行った。塩酸ドキソルビシン導入後のサンプルは氷冷した。生理食塩水で充分に置換したカラム(Sepharose 4 Fast Flow)を用いてゲルろ過を行いリポソームに封入されていない塩酸ドキソルビシンを除去した。

[0080] 実施例1と同様に、リポソームリン脂質の定量、リポソーム内に封入されたドキソルビシン量、粒子径を測定した。得られたリポソームを表1に示す。

[0081] [表1]

表 1

	膜構成 (mol比)	粒子径 nm	薬物担持量 mol薬物/mol脂 質
実施例 1	HSPC : Chol : PEG ₅₀₀₀ -DSPE = 54 : 46 : 1	118.8	0.11
比較例 1	HSPC : Chol : PEG ₅₀₀₀ -DSPE = 54 : 46 : 2	112.9	0.13
実施例 2	SM : Chol : PEG ₅₀₀₀ -DSPE = 54 : 46 : 0.75	107.4	0.12

[0082] (実施例3)

HSPC:Chol:3,5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩を、50/42/8のモル比で、t-ブタノールに溶解し、凍結乾燥させて混合脂質を得た。

300mMのクエン酸溶液と、300mMのクエン酸3ナトリウム溶液を混合してpH4に調整した内水相溶液とした。

混合脂質0.30gを秤量し、pH4に調整した内水相溶液5mlを加え、70°Cで10分間水和させた。時々、55°Cに暖めたバス型ソニケーターで超音波をかけることで、脂質を均一に分散させた。得られた脂質分散液を73°Cに保温したエクストルーダー(Lipex Biomembranes 社製)を用いて、 ϕ 0.4 μ mのメンブレンフィルターを3回、 ϕ 0.2 μ mを3回、 ϕ 0.1 μ mを10回通すことによってLUVの分散液を得た。得られたリポソームの粒子径は111.3nmであった。

上記で調製したリポソーム分散液を、カラム(Sepharose 4 Fast Flow, ϕ 1.5cm × 25cm)に添加し、生理食塩水で溶出させてゲルfiltrationし、外水相を生理食塩水で置換した。

[0083] PEG₅₀₀₀-DSPEを生理食塩水に10mg/mLになるよう溶解し、これを外水相にリポソームの総脂質量に対して0.75mol%分のPEG₅₀₀₀-DSPEとなるように加えて、攪拌しながら60°Cで30分間インキュベートした。

ドキソルビシンを生理食塩水に10mg/mLになるよう溶解し、この液をリポソームの総脂質量に対して20mol%のドキソルビシンとなるように加え、1N NaOHまたは飽和炭酸水素ナトリウム水でpH7.4に調整した後、65°Cで30分インキュベートした。

[0084] 上記において、リポソームリン脂質は、実施例1と同様に定量した。

粒子径はリポソーム分散液100 μ Lを生理食塩水で3mLに希釈して、Zetasizer S

ZEM 5002 (Malvern Instruments.)で測定した。リポソーム内に封入されたドキソルビシン量(薬物担持量=薬剤/脂質)は、ドキソルビシンリポソーム0.1mLに1N HCl 0.3mLとイソプロパノール3.6mLとを混合した液について、480nmでの吸光度を分光光度計で測定して求めた。ドキソルビシン量は、0.12mol/molであった。

[0085] (試験例1)

以下の4種の緩衝液に、PEG₅₀₀₀-DSPE(日本油脂社製)を、5mg/mLとなるよう溶かし、65°Cで90分間加熱した。また、PEG₅₀₀₀-DSPEを、同様の緩衝液に10mg/mLとなるよう溶かし、40°Cで1週間保存した。

緩衝液(1):硫酸アンモニウム(250mM)

緩衝液(2):L-Histidine(10mM), 10% Sucrose pH6.5

緩衝液(3):クエン酸(300mM) pH4.0

緩衝液(4):クエン酸(300mM) pH7.5

[0086] 保存後の溶液を10μLとり、20cm×20cmのシリカゲル薄層板の下部より1cmのところへスポットした。予めクロロホルム/メタノール/アンモニア水(28)混液(85:14:1)の展開溶媒で平衡化したガラス容器の中へ、シリカゲル薄層板を入れ、展開溶媒にて約15cm展開し、ヨウ素発色法により分解物を検索した。この薄層クロマトグラフィー(TLC)を図1～2に示す。図1は、PEG₅₀₀₀-DSPE溶液を65°C、90分間加温後のTLCの結果であり、図2は、PEG₅₀₀₀-DSPE溶液を40°C、1週間加温後のTLCの結果である。その結果、pH5以上の緩衝液に溶かしたものについては、加温前後で分解物(リゾ体)の位置(Lyo-PEG Stdのスポット参照)にスポットの増大を認めなかつたが、pH4の緩衝液中に溶解させた物については明確に分解物(リゾ体)のスポットの増大を認めた。

[0087] 試験例1は、酸性条件下における親水性高分子脂質誘導体(PEG₅₀₀₀-DSPE)の安定性のデータを示す。PEG₅₀₀₀-DSPEは、酸性条件(緩衝液(3)クエン酸pH4.0)で加温すると分解が進行することを示している。すなわち、比較例1に例示した酸性緩衝液条件下にPEG₅₀₀₀-DSPEが存在する方法で製造するリポソームでは、製造時および保存時においてPEG₅₀₀₀-DSPEの分解が予想される。また、比較例1の方法で製造したリポソームは、内水相が酸性であり、内水相側に分布するPEG₅₀₀₀-DSP

Eの分解も予想される。その結果を試験例2に示す。

[0088] (試験例2) 実施例1と比較例1のリポソームにおけるPEGの分解挙動比較

実施例1と比較例1によって調製したリポソーム2種を40°Cで1週間・2週間保存後、HPLC法を用いてPEG₅₀₀₀-DSPE定量した。結果を、4°C保存のPEGリポソームに対するPEG₅₀₀₀-DSPEの残存率で図3に示す。

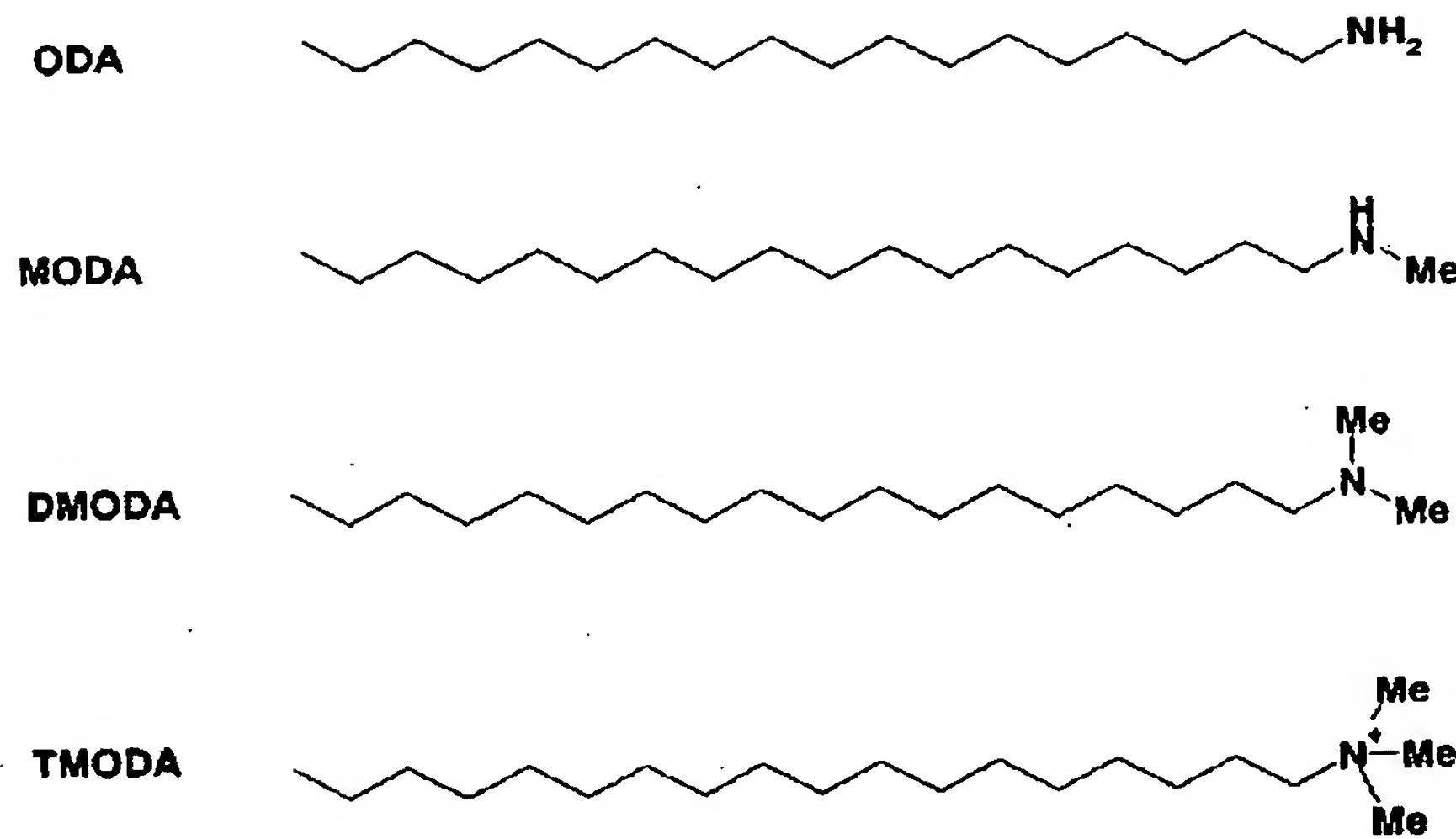
試験例2の結果は、比較例1のリポソームでは、PEG₅₀₀₀-DSPEの残存率が低下し、PEG₅₀₀₀-DSPEの分解が起きていることを示している。一方、実施例1の本発明のリポソームではPEG₅₀₀₀-DSPEの残存率に変化がなく、PEG₅₀₀₀-DSPEの分解が起きてないことを示している。

すなわちPEG₅₀₀₀-DSPEの分解を防ぐことにより、PEG₅₀₀₀-DSPEの分解に伴う脂質二重膜の不安定化、リポソームの担持薬剤の漏出、リポソームの凝集、リポソームの血しょう蛋白やオプソニン蛋白との吸着防止効果の低下、リポソームの血中での安定性を損なう等の課題を克服することができる。

[0089] (実施例4)

HSPC:Chol:塩基性脂質((1)ODA、(2)MODA、(3)DMODAまたは(4)TMODA)=50:42:8(mol比)になるように各脂質を秤量し、エタノールに溶解させた。完全溶解確認後、硫酸アンモニウム溶液(250mM)を9mL加え、68°Cにて加温攪拌を行った。加温攪拌終了後68°Cに加温したエクストルーダーを用いて1.0MPaにて孔径200nmのフィルターを2.0MPaにて5回通し、孔径100nmのフィルターに交換しさらに5回通した。再度孔径100nmのフィルターに交換し、2.0MPaにてさらに5回通した。エクストルージョン後のサンプルに、PEG₅₀₀₀-DSPE導入率0.75mol%になるようにPEG₅₀₀₀-DSPE溶液(36.74mg/mL(RO水))を2mL加え60°C、30分加温攪拌を行い、PEG₅₀₀₀-DSPEを導入する。導入後のサンプルは氷冷した。上記で用いた塩基性脂質の各構造を以下に示す。

[0090] [化1]



[0091] 上記で調製したリポソーム分散液を、10% Sucrose (pH9. 0) の溶液で充分に置換したゲルカラム (Sephadex G-25 Fast Flow) にてゲルろ過を行い、pH勾配を形成した。ゲルろ過後のサンプルは氷冷した。

[0092] さらにHPLC定量より算出されたHPLC濃度をもとに、塩酸ドキソルビシン (Dox) / 総脂質 (Total Lipid) (mol/mol) = 0. 16 (Dox / Total Lipid (w/w) = 0. 18) になるよう 塩酸ドキソルビシン量を計算した。計算結果をもとに必要量の塩酸ドキソルビシンを秤量し、10% Sucrose (pH9. 0) 溶液を用いて10mg / mLの溶液を調製した。リポソーム分散液に所定量の塩酸ドキソルビシン溶液 (10mg / mL) を加え60°Cで60分攪拌を行い塩酸ドキソルビシンの導入を行った。塩酸ドキソルビシン導入後のサンプルは氷冷した。10% Sucrose (pH6. 5) の溶液で充分に置換したカラム (Sephadex G-25 Fast Flow, φ 2. 8cm × 20cm) を用いてゲルろ過を行い、リポソームに封入されていない塩酸ドキソルビシンを除去した。

[0093] 上記各塩基性脂質に対応して得られたリポソーム製剤(1)～(4)のリン脂質の定量、粒子径及びZeta電位を測定した。
この実施例において、リポソームリン脂質は、リン脂質Cテストワコー (和光純薬社製) を用いて定量した。
粒子径は、リポソーム分散液20 μLを生理食塩水で3mLに希釈し、

Zetasizer3000HS (Malvern Instruments.)で測定した平均粒子径である。粒子径は、リポソーム分散液20 μ Lを生理食塩水で3mLに希釈し、Zetasizer3000HS (Malvern Instruments.)で測定した平均粒子径である。

ゼータ(Zeta)電位を以下のように測定した。

2. 5mLのシリンジにRO水を約2. 5mL量る。押し子を引きながらシリンジ先端部からリポソーム分散液を20 μ Lおよびダルベッコ(Dulbecco's)PBSを20 μ L加えたのち、押し子を押しエアーを抜く。転倒混和し均一に分散させた後Zetasizer3000HSにてZeta電位測定を行う。

実施例4のリポソーム製剤(1)～(4)についての測定結果を、実施例1のリポソーム製剤についての測定結果とともに表2に示す。

[0094] (実施例5)

HSPC:Chol:塩基性脂質(TMODA)=((1)53.5:45.5:1)、(2)(53:45:2)、(3)(52:44:4)、(4)(45.4:38.6:16)(mol比)になるように各脂質を秤量し、エタノールに溶解させた。以降の操作は(実施例4)と同様の操作手順で調製した。

実施例4と同様に、上記各塩基性脂質比に対応して得られたリポソーム製剤(1)～(4)のリン脂質の定量、粒子径およびZeta電位を測定した。結果を表2に示す。

[0095] [表2]

表2

	膜構成 (mol比)	粒径 nm	Zeta電位 mV
実施例 1	HSPC: Chol: PEG ₅₀₀₀ -DSPE =54:46:0.75	110.9	-6.1
実施例 4 (1)	HSPC: Chol:ODA: PEG ₅₀₀₀ -DSPE =50:42:8:0.75	119.7	2.2
実施例 4 (2)	HSPC: Chol: MODA: PEG ₅₀₀₀ -DSPE =50:42:8:0.75	118.2	1.9
実施例 4 (3)	HSPC: Chol: DMODA: PEG ₅₀₀₀ -DSPE =50:42:8:0.75	120.3	2.7
実施例 4 (4)	HSPC: Chol: TMODA: PEG ₅₀₀₀ -DSPE =50:42:8:0.75	113.1	4.6
実施例 5 (1)	HSPC: Chol: TMODA: PEG ₅₀₀₀ -DSPE =53.5:45.5:1:0.75	119.0	-3.3
実施例 5 (2)	HSPC: Chol: TMODA: PEG ₅₀₀₀ -DSPE =53:45:2:0.75	120.6	-3.0
実施例 5 (3)	HSPC: Chol: TMODA: PEG ₅₀₀₀ -DSPE =52:45:4:0.75	124.3	-1.6
実施例 5 (4)	HSPC: Chol: TMODA: PEG ₅₀₀₀ -DSPE =45.4:38.6:16:0.75	110.3	5.1

[0096] (試験例3)リポソーム製剤におけるPEGの分解挙動

実施例4および実施例5で調製したリポソーム製剤(各実施例のリポソーム製剤(4)を40°Cで2週間保存後、HPLC法を用いてPEG₅₀₀₀-DSPE定量した。実施例1(塩基性化合物なし)のリポソーム製剤の結果(試験例2)とともに、4°C保存のPEGリポソームに対するPEG₅₀₀₀-DSPEの残存率で表3に示す。塩基性化合物を含有することにより、塩基性化合物の含量依存的にPEG₅₀₀₀-DSPEの含量低下が、より一層抑えられていることがわかった。

[0097] [表3]

表3

	膜構成 (mol比)	PEG ₅₀₀₀ -DSPE の残存率(%)
実施例 1	HSPC: Chol: PEG ₅₀₀₀ -DSPE =54 : 46 : 0.75	97.6
実施例 4 (4)	HSPC: Chol:TMODA:PEG ₅₀₀₀ -DSPE =50 : 42 : 8 : 0.75	99.0
実施例 5 (4)	HSPC: Chol:TMODA:PEG ₅₀₀₀ -DSPE =45.4 : 38.6 : 16 : 0.75	101.7

[0098] (試験例4)リポソーム製剤におけるHSPCの分解挙動

実施例4および実施例1で調製したリポソーム製剤を40°Cで1週間／2週間保存後、HPLC法を用いてHSPCの分解物の割合(%)を定量した。HSPC分解物の割合(%)の計算方法を以下に示す。

[0099] [数1]

$$\text{HSPCの分解物の割合(%)} = \frac{\text{HSPCの分解物の総ピーク面積}}{\text{HSPCの総ピーク面積} + \text{HSPCの分解物の総ピーク面積}} \times 100$$

[0100] 試験例4の結果を、図4および図5に示す。

図4に示すように、実施例4のリポソーム製剤は、実施例1のリポソームに比べてHSPCの分解物の割合(%)が少なく、HSPCの加水分解が抑制されていることを示している。またHSPCの分解物の割合(%)は塩基性化合物の構造に大きく依存していないことがわかる。

図5は、実施例4のリポソーム製剤の0週、1週、2週(図中、0W, 1W, 2W)の各試験期間における、塩基性化合物(TMOSA)の含有率(mol%)に対するHSPCの分解物の割合(%)についての結果を示す。図5に示すように、塩基性化合物の含有率

(mol%) が高くなるに伴い、HSPCの分解物の割合(%)が抑えられていることがわかる。

[0101] 上記に示すように、PEG脂質(PEG₅₀₀₀-DSPE)をリポソームの脂質二重膜の外側に担持することで、PEG₅₀₀₀-DSPEの分解を防ぐことができる。さらに、塩基性化合物を脂質膜に導入することでPEG₅₀₀₀-DSPEの分解の更なる抑制、HSPCの加水分解も抑制することができ、酸性環境で保持する必要のある薬物を内水相に含ませる場合であってもリポソーム製剤を安定化することができる。本発明により、リポソーム製剤における脂質二重膜の不安定化、リポソームの担持薬剤の漏出、リポソームの凝集、リポソームの血しょう蛋白やオプソニン蛋白との吸着防止効果の低下、リポソームの血中での安定性を損なう等の課題を克服することができる。

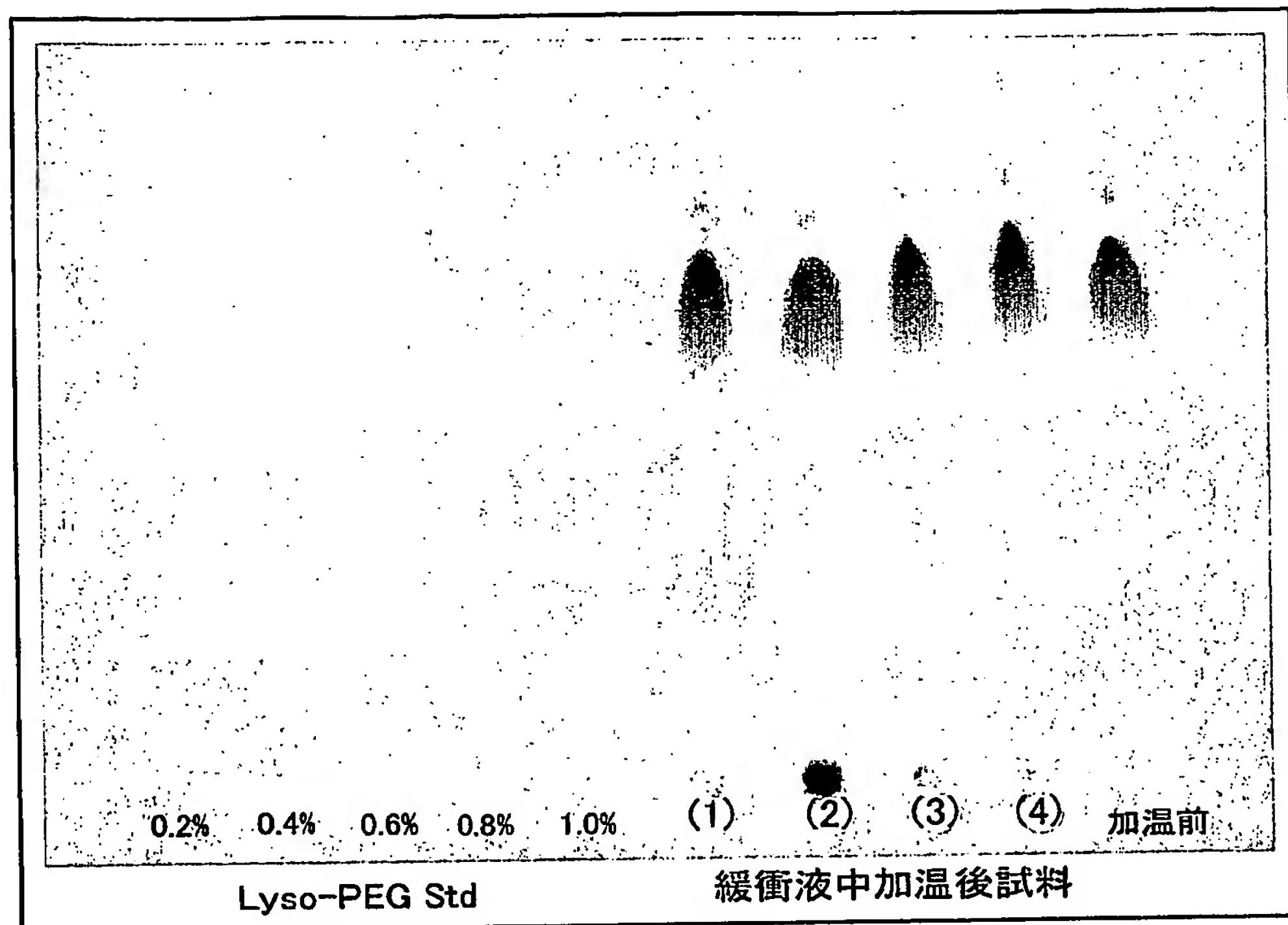
請求の範囲

- [1] リン脂質を主膜材として含む脂質二重膜で形成されたユニラメラ小胞と、該小胞内に存在するpHが5以下の内水相とを備え、かつ薬物を担持させたリポソームであつて、前記小胞は、外表面のみが親水性高分子で修飾されたものである、リポソーム製剤。
- [2] 前記薬物が、pH5より大きいpH領域で不安定な薬物である請求項1に記載のリポソーム製剤。
- [3] 前記薬物を、少なくとも0.05mol薬物/mol脂質の濃度で担持する請求項1または2に記載のリポソーム製剤。
- [4] 前記薬物を、少なくとも0.1mol薬物/mol脂質の濃度で担持する請求項1または2に記載のリポソーム製剤。
- [5] 前記主膜材が、相転移点50℃以上のリン脂質である請求項1ー4のいずれかに記載のリポソーム製剤。
- [6] 前記リン脂質が、水素添加されたリン脂質である請求項1ー5のいずれかに記載のリポソーム製剤。
- [7] 前記リン脂質が、スフィンゴリン脂質である請求項1ー5のいずれかに記載のリポソーム製剤。
- [8] 前記脂質二重膜の膜成分として、前記リン脂質以外の他の脂質類をさらに含む請求項1ー7のいずれかに記載のリポソーム製剤。
- [9] 前記脂質二重膜の膜成分として、コレステロールをさらに含む請求項6または7に記載のリポソーム製剤。
- [10] 前記脂質二重膜の膜成分として、アミノ基、アミジノ基およびグアジニノ基から選ばれる基を含む塩基性化合物をさらに含む請求項1ー9のいずれかに記載のリポソーム製剤。
- [11] 前記塩基性化合物が、3,5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩である請求項10に記載のリポソーム製剤。
- [12] 前記親水性高分子が、分子量500ー10,000ダルトンのポリエチレングリコールである請求項1ー11のいずれかに記載のリポソーム製剤。

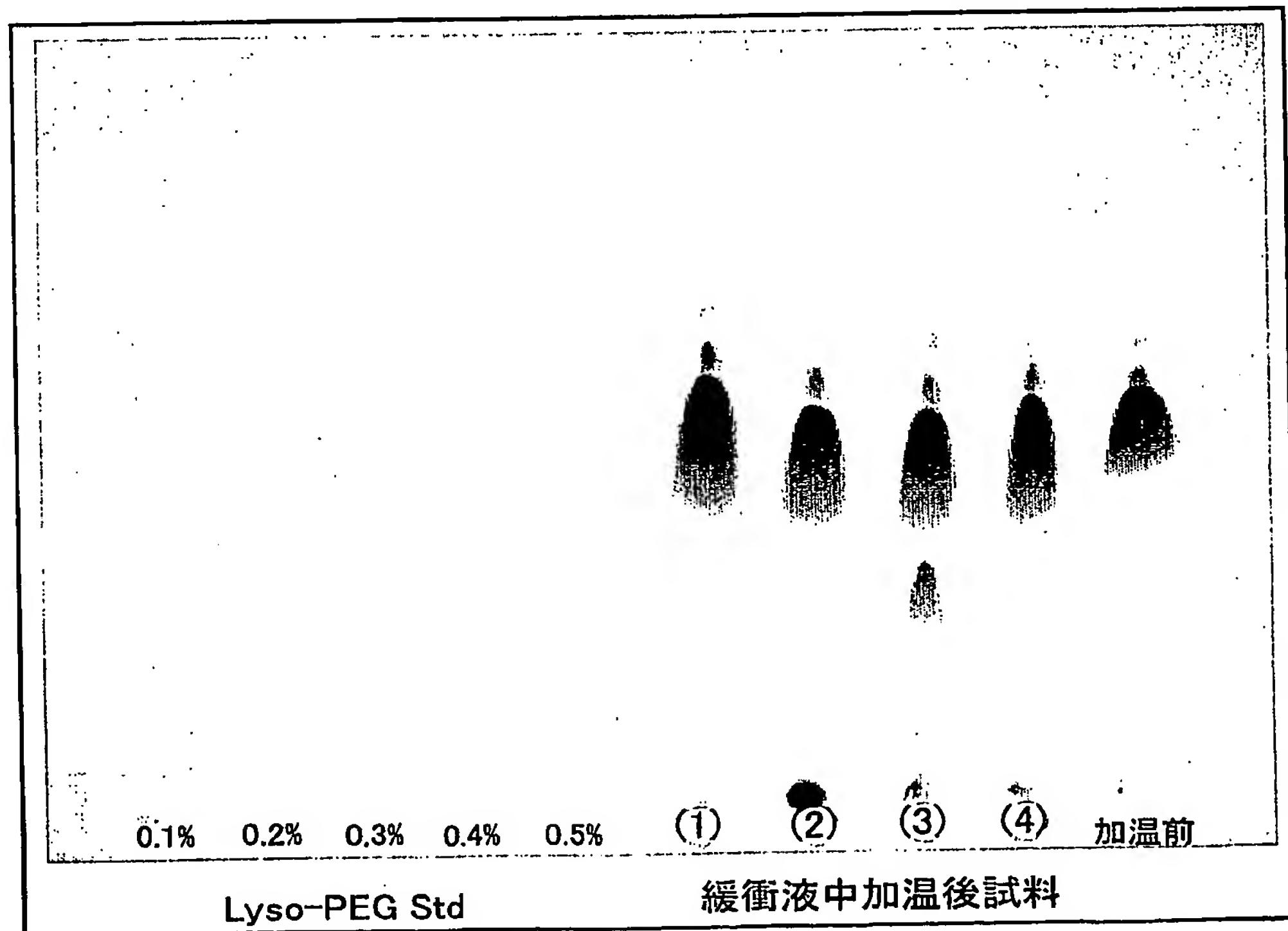
- [13] 前記親水性高分子は、親水性高分子のリン脂質またはコレステロール誘導体として導入される請求項1～12のいずれかに記載のリポソーム製剤。
- [14] 前記リポソーム製剤の平均粒子径が、40～140nmである請求項1～13のいずれかに記載のリポソーム製剤。
- [15] 前記リポソーム製剤の平均粒子径が、50～130nmである請求項1～13のいずれかに記載のリポソーム製剤。
- [16] 前記リポソーム製剤の平均粒子径が、60～120nmである請求項1～13のいずれかに記載のリポソーム製剤。
- [17] 前記内水相のpHが2～5である請求項1～15のいずれかに記載のリポソーム製剤。
- [18] 内水相のpHが5以下となるように、リン脂質を含む脂質二重膜のユニラメラ層構造の小胞を調製した後、親水性高分子脂質誘導体を添加して前記小胞の外表面のみを修飾し、小胞の調製時に内水相にあらかじめ添加するか、小胞調製後に小胞外から前記脂質二重膜を通過せしめて薬物を封入して薬物を封入して薬物を担持させる請求項1に記載のリポソーム製剤の製造方法。

1/3

【図 1】

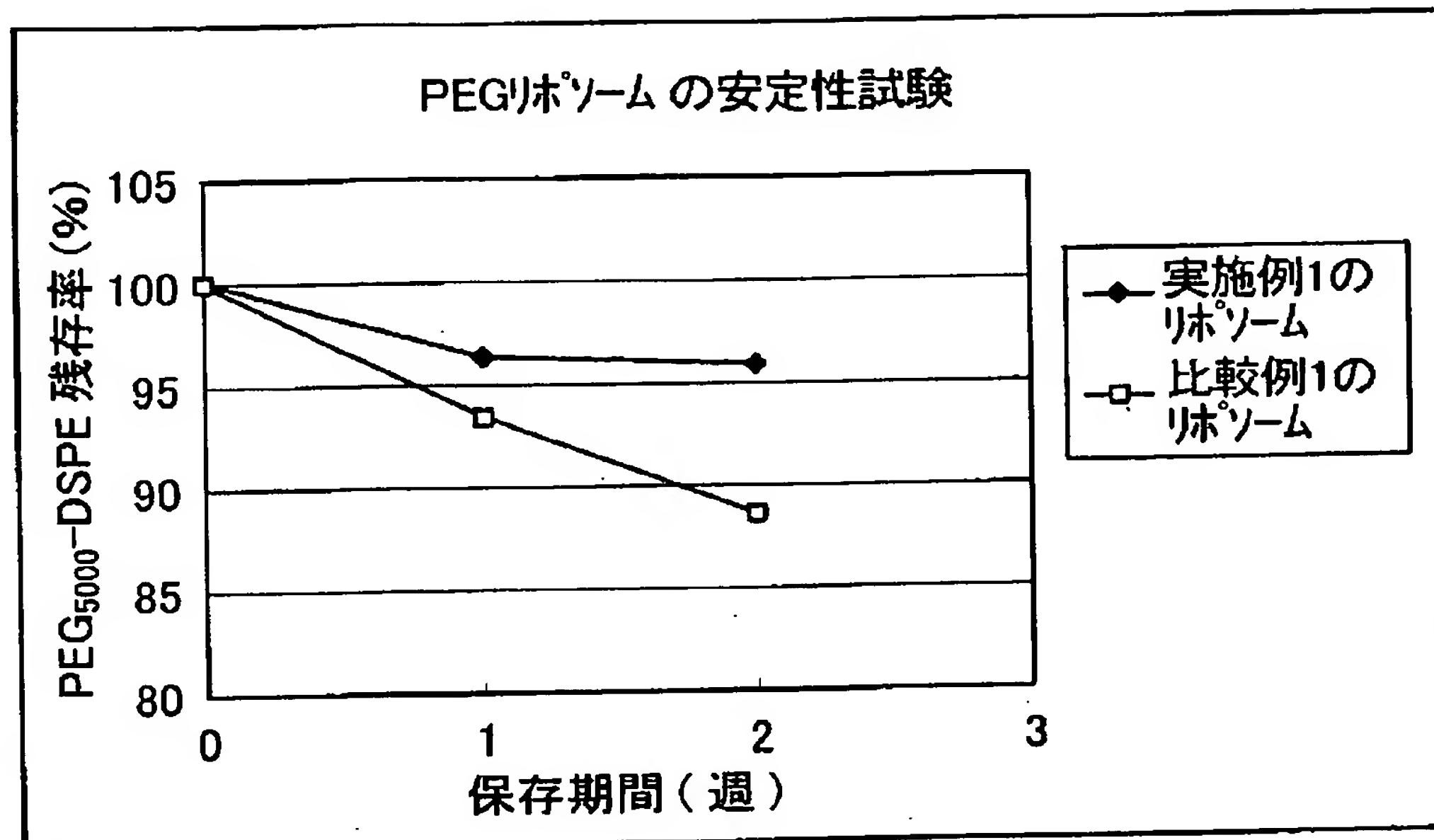


【図 2】

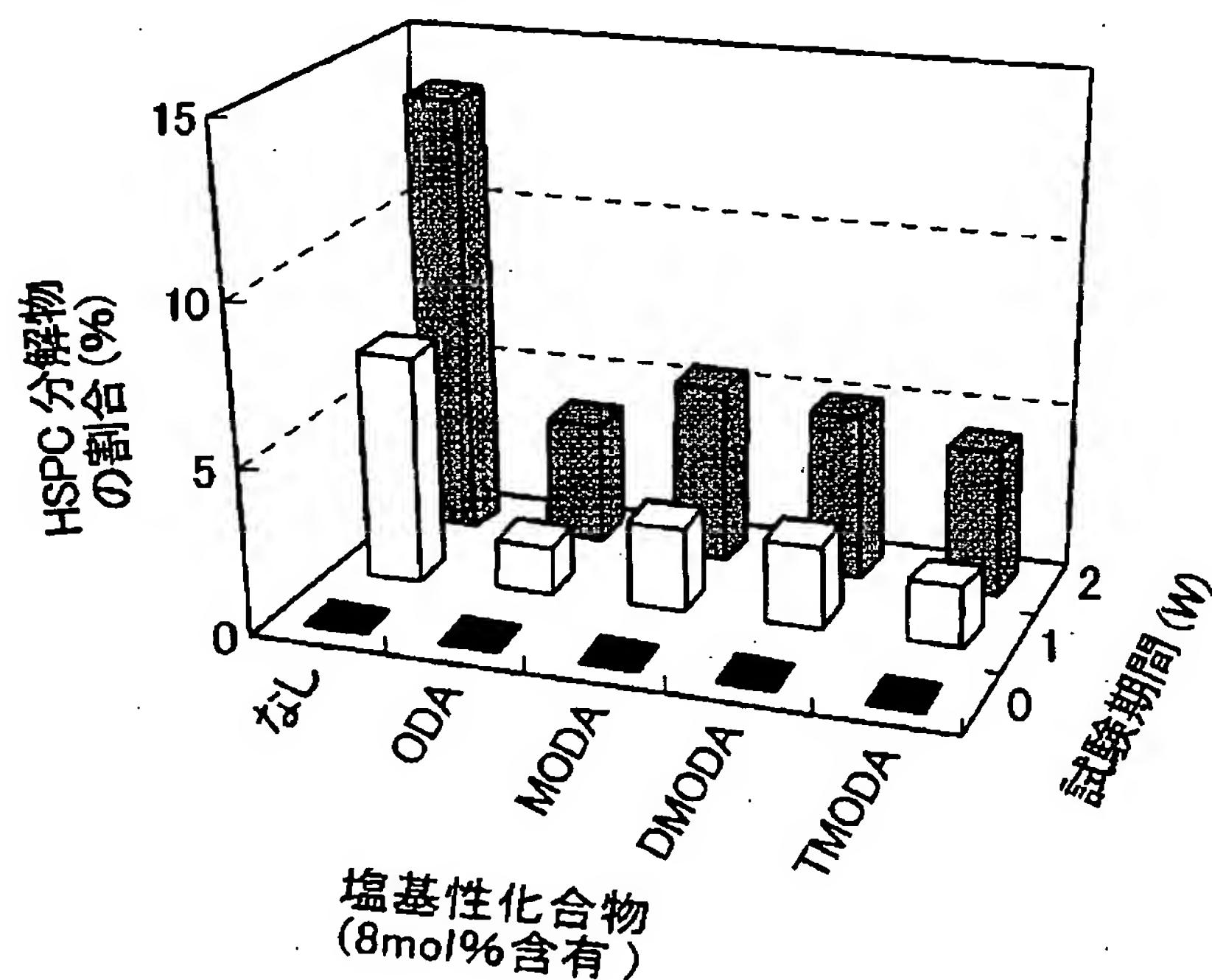


差替え用紙 (規則26)

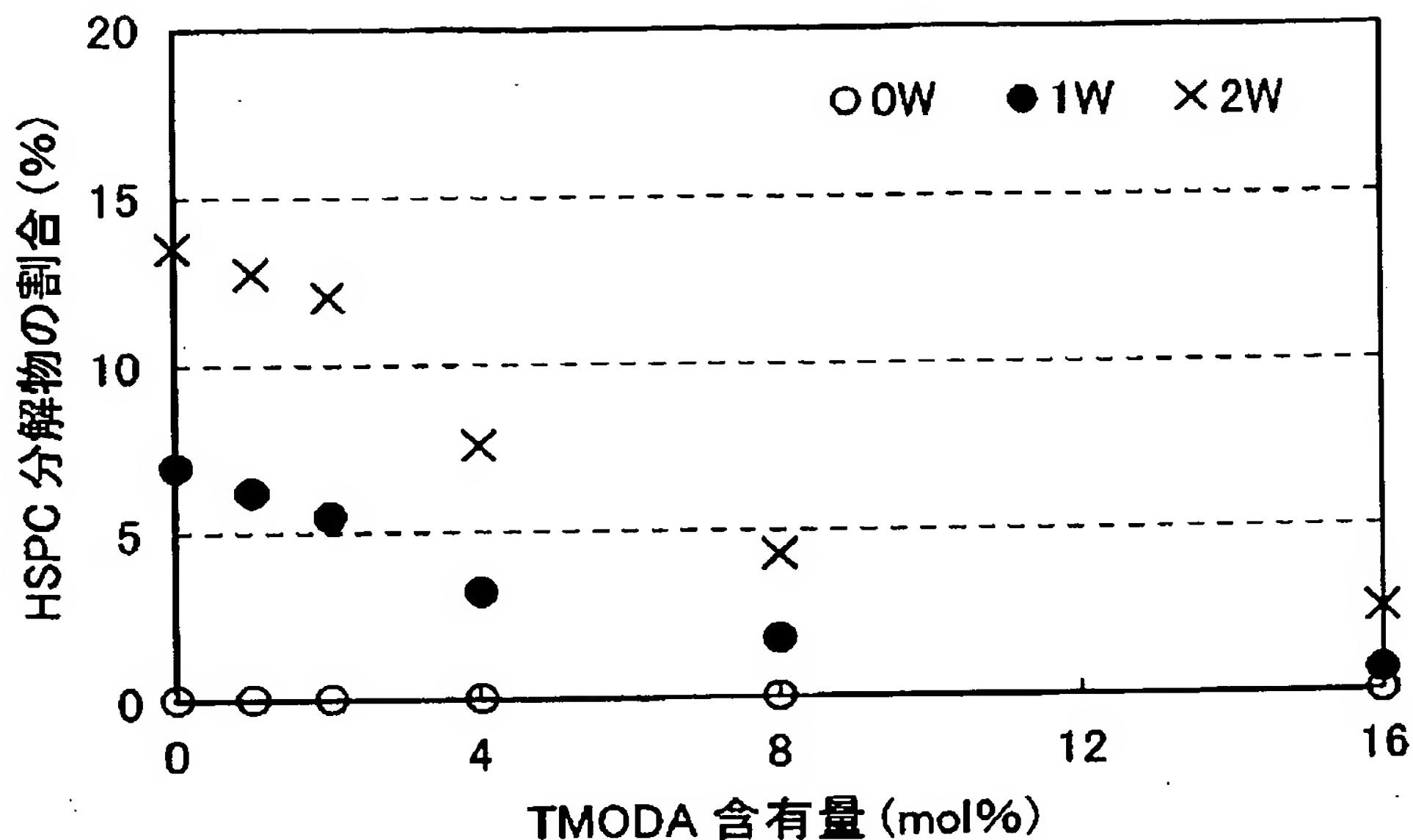
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005577

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K47/24, 9/127, 31/704, 47/14, 47/28, 47/30, 47/34,
A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K47/24, 9/127, 31/704, 47/14, 47/28, 47/30, 47/34,
A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 6-501246 A (The Liposome Co., Ltd.), 10 February, 1994 (10.02.94), Claims 1 to 10; example 1 & WO 92/02244 A1 & EP 555229 A1	1-18
Y	JP 2-196713 A (Yissum Research (Development Co.) of the Hebrew University of Jerusalem), 03 August, 1990 (03.08.90), Claim 1; page 5, upper left column, lines 3 to 11; page 7, upper right column, line 5 to lower left column, line 8 & EP 361894 A2 & US 5192549 A	1-18

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 21 April, 2005 (21.04.05)	Date of mailing of the international search report 17 May, 2005 (17.05.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005577

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-55343 A (Terumo Corp.), 27 February, 2001 (27.02.01), Claims 1 to 15; Par. Nos. [0034] to [0043], [0050], [0058], [0061] & WO 00/25748 A1 & EP 1044679 A1	1-18
Y	WO 2003/15753 A1 (Terumo Corp.), 27 February, 2003 (27.02.03), Claims 1 to 6; example 1 (Family: none)	1-18

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.7 A61K47/24, 9/127, 31/704, 47/14, 47/28, 47/30, 47/34, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.7 A61K47/24, 9/127, 31/704, 47/14, 47/28, 47/30, 47/34, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 6-501246 A (ザ リポソーム カンパニー, インコーポレイテッド) 1994.02.10 請求項1-10, 実施例1 & WO 92/02244 A1 & EP 555229 A1	1-18
Y	JP 2-196713 A (イツサム リサーチ デベロップメント カンパニー オブ ザ ヒーブル ユニバーシティ オブ エルサレム) 1990.08.03 請求項1, 第5頁左上欄第3~11行, 第7頁右上欄第5行~同頁左下欄第8行 & EP 361894 A2 & US 5192549 A	1-18

 C欄の続きにも文献が列挙されている。

〔パテントファミリーに関する別紙を参照。〕

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 21.04.2005	国際調査報告の発送日 17.5.2005
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 榎本 佳予子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	JP 2001-55343 A (テルモ株式会社) 2001.02.27 請求項1-15, 【0034】～【0043】,【0050】,【0058】,【0061】 & WO 00/25748 A1 & EP 1044679 A1	1-18
Y	WO 2003/15753 A1 (テルモ株式会社) 2003.02.27 請求項1-6, 実施例1 (ファミリーなし)	1-18